

(54) HUMAN LYMPHOCYTE SURFACE ANTIGEN AND GENE CODING THEREOF

(11) 3-48696 (A) (43) 1.3.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-183264 (22) 14.7.1989
 (71) TORAY IND INC (72) RITSUKO SAWADA(1)
 (51) Int. Cl.⁵. C07K13/00, C12N15/12//A61K39/00, C12P21/02(C12P21/02, C12R1/91)

NEW MATERIAL: A human lymphocyte surface antigen having an amino acid sequence of the formula and the same active substance.

USE: A reagent for researching autoimmune disease patients and a material for preparing a treating agent of the autoimmune diseases, cancer, infectious diseases, etc.

PREPARATION: For example, a monocytic leukemia cell is cultured in a CO₂ incubator, treated with a lithium chloride/guanidine thiocyanate solution, homogenized, layered on a cesium chloride solution and subsequently centrifuged to separate RNA, which is treated with an oligo dT cellulose column to prepare poly A⁺ RNA. The poly A⁺ RNA is used to prepare cDNA with a reverse transcriptase and further prepare cDNA library by a conventional method. The cDNA library is screened with a probe to select a DNA coding a human lymphocyte surface antigen, which is treating by a conventional method to prepare a manifestation vector. The vector is introduced into a host, transformed and cultured to provide the human lymphocyte surface antigen of the formula.

```

LeuGlnCysTyrAsnCysProAsnProThrAlaAspCysLysThrAlaValAsnCysSerSer
1      10
AspPheAspAlaCysLeuTleThrLysAlaGlyLeuGlnValTyrAsnLysCysTyrLys
20
PheGluHisCysAsnPheAsnAspValThrThrArgLeuArgGluAsnGluLeuThrTyr
30
TyrCysCysLysLysAspLeuCysAsnPheAsnGluGlnLeuGluAsnGlyClyThrSer
40
LeuSerGluLysThrValLeuLeuLeuValThrProPheLeuAlaAlaLeuTyrGlnLeu
50
HisPhe
103

```

(54) PREPARATION OF CONCENTRATED AND PURIFIED EPITHELIOCYTE CELL GROWTH FACTOR

(11) 3-48697 (A) (43) 1.3.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-184103 (22) 17.7.1989
 (71) HITACHI CHEM CO LTD (72) TETSUO ONUKI(3)
 (51) Int. Cl.⁵. C07K15/06, C07K3/24

PURPOSE: To prepare the subject growth factor in simple operations within a short time in a large amount by subjecting an epitheliocyte-containing solution to a salting-out treatment at a specific pH.

CONSTITUTION: An epitheliocyte growth factor(EGF)-containing solution (e.g. urine or serum) is adjusted to a pH of 4.0-5.0 (preferably a pH of 4.4-4.6) with acetic chloride, hydrochloric acid, NaOH, etc., mixed with a salt (preferably ammonium sulfate having a saturation degree of 0.40-1.0) capable of precipitating the EGF, again adjusted to a pH of 4.0-5.0, allowed to stand at a solution temperature of 0-50°C (preferably 0-10°C) and subsequently subjected to a separation process such as centrifugal separation to separate the growth factor, which is dissolved in a small amount of a physiological saline, etc., to provide the objective growth factor.

(54) CELL GROWTH FACTOR AND EXTRACTION THEREOF

(11) 3-48698 (A) (43) 1.3.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-184989 (22) 18.7.1989
 (71) NIPPON SUISAN KAISHA LTD (72) EIZO NAGAHISA(1)
 (51) Int. Cl.⁵. C07K15/08, C07K3/02

PURPOSE: To readily and massively extract the subject novel factor effectively acting to many kinds of cells at a low cost by homogenizing the spawns of a salmon with a saline solution and separating a water-soluble fraction.

CONSTITUTION: The spawns of a salmon (preferably the matured spawns of a white salmon) is homogenized in a saline solution (preferably containing 0.1-3% of salt) and a water-soluble fraction containing the objective factor is separated. The separation of the water-soluble fraction from the homogenized product is performed e.g. by removing water insolubles from the homogenized product by a centrifugal precipitation method, etc., and subsequently washing the remaining supernatant with an organic solvent such as n-hexane for defatting.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-48696

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)3月1日

C 07 K 13/00
C 12 N 15/12
// A 61 K 39/00
C 12 P 21/02

ZNA

8619-4H

H

8829-4C

A

8214-4B

C

8214-4B

(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全12頁)

⑮ 発明の名称 ヒトリンパ球表面抗原およびそれをコードする遺伝子

⑯ 特 願 平1-183264

⑰ 出 願 平1(1989)7月14日

⑱ 発 明 者 沢 田 律 子 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

⑲ 発 明 者 成 戸 昌 信 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

⑳ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

ヒトリンパ球表面抗原およびそれをコードする
遺伝子

2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 下記のアミノ酸配列を有するヒトリンパ球表
面抗原およびその同効物。

LeuGlnCysTyrAsnCysProAsnProThrAlaAspCysLysThrAlaValAsnCysSerSer
1 10 20

AspPheAspAlaCysLeuIleThrLysAlaGlyLeuGlnValTyrAsnLysCysTrpLys
30 40

PheGluHisCysAsnPheAsnAspValThrThrArgLeuArgGluAsnGluLeuThrTyr
50 60

TyrCysCysLysLysAspLeuCysAsnPheAsnGluGlnLeuGluAsnGlyGlyThrSer
70 80

LeuSerGluLysThrValLeuLeuLeuValThrProPheLeuAlaAlaAlaTrpSerLeu
90 100

HisPro
103

(2) 請求項(1)記載のヒトリンパ球表面抗原または
その同効物をコードする遺伝子。

(3) 下記塩基配列を有する請求項(2)記載の遺伝
子。

10 20 30 40 50 60
CAGTGTCTACA ACTGTCTCTAA CCCAAGTCT GACTGCAAAA CAGCCCTCAA TTGTTTCATCT
70 80 90 100 110 120
GATTTTGATG CGTGTCTCAT TACCAAGCT GGGTTACAAG TGTATAACAA GTGTTGGAAG
130 140 150 160 170 180
TTTGAGCATT GCAATTTCAA CGACGTCACA ACCCGCTTGA GGGAAAATGA GCTAACGTAC
190 200 210 220 230 240
TACTGCTGCA AGAAGGACCT GTGTAACCTT AACGAACAGC TTGAAAATGG TGGGACATCC
250 260 270 280 290 300
TTATCAGAGA AAACAGTTCT TCTGCTGGTG ACTCCATTTC TGGCAGCAGC CTGGAGCCTT
310 320 330 340
CATCCCTAAG TCAACACCAG GAGAGCTTCT CCCAAA

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、ヒトリンパ球表面抗原を構成する純
化されたタンパク質およびそれをコードする遺伝
子に関する。さらに詳しくは、本発明はマウスの
リンパ球抗原Ly6に対応する純化されたヒトリ
ンパ球抗原およびそれをコードする遺伝子を提供
するものである。

〔従来の技術〕

Ly6抗原はマウスのリンパ球に見いだされた
表面抗原であり、主としてTリンパ球、NK細胞、

単球などの表面にホスファチジルイノシトールで細胞膜に錨を下した (P I アンカリングタンパク質) 形で存在する。L y 6 はリンパ球の活性化に強く関与し、L y 6 に対するモノクローナル抗体は、ある場合には単独で、ある場合には架橋などの処理を行なうことによって、マウスリンパ球の機能を活性化する。

一方、L y 6 抗原に対する抗体を用いたフローサイトメーターによる解析では、例えば M R L / \bar{d} マウス (M R L / $\bar{M}_p - \bar{d}_{pr} / \bar{d}_{pr}$) などの自己免疫疾患モデルマウスにおいて、L y 6 陽性細胞の数と細胞あたりの L y 6 抗原の数が顕著に多くなっていることが知られている。

マウスにおける L y 6 抗原は数種からなるファミリーを形成し、またマウスの遺伝的系列によって配列がわずかに異なる亜型の存在が報告されている。ただし、それらの間の類似性 (ホモロジー) はかなり大きい。

以上のことから、L y 6 はリンパ球活性化のメカニズムの少なくとも1つに強く関与し、また自

己免疫疾患に伴なう現象として、L y 6 陽性細胞が多くなっていることがわかる。従って、L y 6 そのものおよびその関与するリンパ球活性化のメカニズムをより詳しく研究することは、リンパ球活性化を利用する抗ガン薬や抗感染症薬の開発につながり、一方、L y 6 の機能を抑制することによる免疫抑制薬の開発につながることが期待できる。

しかしながら、マウスリンパ球の L y 6 抗原に対応するヒトリンパ球の抗原は未だ同定されていない。このような場合の一般的な手法である、マウス遺伝子をプローブとした対応するヒト遺伝子のハイブリダイゼーションによるクローニングの試みは成功していない。

本発明者らは、まず本発明者らが独自に作成したマウス L G L (大顆粒リンパ球) に対する抗体の中から選んだモノクローナル抗体 F 4 が、その免疫化学的解析からマウスリンパ球抗原 L y 6 を認識する抗体であるとの確信を得た。このことは後に、Brian Seed 法 (Brian Seed, Nature, 329,

840~842 (1987); Brian Seedら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369 (1987)) により、F 4 抗体を足がかりにして本発明者らによりクローニングされた c D N A が、既知の L y 6 (L y 6 C 1) の遺伝子であることを証明することによって確認された。

そこで本発明者らは、第一段階として、前記の F 4 抗体を用いて、ヒト末梢血リンパ球や各種ヒト白血病細胞株をフローサイトメーターで解析してみたが、それらのどの細胞も F 4 抗体とは特異的な結合性を示さなかった。このことより F 4 抗体は、マウス L y 6 に対応するヒトリンパ球抗原をクローニングするための手がかりにはならないことがわかった。

同時に本発明者らは、本発明者らのクローニングしたマウス L y 6 C 1 の c D N A をプローブとして、ヒト末梢血リンパ球や各種ヒト白血病細胞株の m R N A をノザン法によって解析したが、特異的な陽性信号は認められなかった。また同時に、ヒト末梢血リンパ球や数種のヒト白血病細胞株の

c D N A ライブラリーを、ラジオアイソトープラベルした前記マウス L y 6 C 2 の c D N A をプローブとしてハイブリダイゼーションによってスクリーニングしたが、特異的な陽性クローンは得られなかった。このことから、マウス L y 6 の c D N A をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法による方法では、マウス L y 6 に対応するヒトのリンパ球抗原をクローニングすることは、困難もしくは不可能であることがわかった。

一方、ヒトリンパ球に対するモノクローナル抗体の中の1種 M E M 4 3 は、その認識する細胞および抗原の挙動から、マウス L y 6 に対応するリンパ球抗原を認識しているらしいという示唆がある (Stefanova, l.ら, Molecular Immunology, 26, 153-161 (1989))。

さらに、ヒトリンパ球細胞の細胞抽出画分を M E M 4 3 抗体を用いて精製することによって、均一な精製タンパク質が得られ、そのタンパク質の N 末端 17 アミノ酸の配列が L Q C Y N C P N P T A D C K T A V であると報告されている (上記

文献)。

また最近、MEM43抗体の認識する抗原をCD59と命名しようという提案がある(第4回 International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation、および Stephan Shav, Nature, 338, 539-540 (1989) 参照)。これらの研究結果は、あくまでもMEM43抗体が認識する抗原が、マウスLy6に対応するヒトリンパ球抗原であるかも知れないという示唆にすぎず、また、これらの過去の研究結果からは、MEM43抗体の認識するヒト抗原の特定化は極めて不十分である。

[発明が解決しようとする課題]

本発明はかかる状況に鑑み、マウスLy6に対応する純化されたヒトリンパ球抗原タンパク質と、それをコードする遺伝子を取得することを目的とする。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは、第3図(a)に示したMEM43抗体の認識する抗原タンパク質のN末端アミノ

酸配列に基づいて、その遺伝子をクローニングすることによって全遺伝子配列を明らかにし、同時に全アミノ酸配列を明らかにすることによってタンパク質としての全容を明らかにし、これによってこのタンパク質が明らかにマウスLy6に対応するヒトリンパ球抗原であることが確認され、もって本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、第1図に示すアミノ酸配列を有するヒトリンパ球表面抗原およびその同効物、さらにそれをコードする遺伝子を提供するものである。

本発明の遺伝子配列の一例を第2図に示す。

以下、本発明を詳細に説明する。

プローブおよびプライマーとしてのDNAオリゴマーは、第3図(a)に基づいて、第3図(b)、(c)、(d)に示される3種類Ly61、Ly2およびLy3を合成した。Ly61は、アミノ酸配列をコードするmRNA鎖側の配列であり、Ly2とLy3はmRNAに相補な側の配列として合成した。図中、Iはデオキシイノシンを示し、Iの相補鎖はIとする。2種類の塩基をタテに並

べたものは混合物として合成した。

次に、種々のヒトリンパ球系細胞を培養し、通常の方法でmRNAを含むRNA画分を抽出した。用いた細胞は、次のとおりである。

ヒト末梢血リンパ球画分をLPS(リボポリサッカライド)で刺激したもの、ヒト扁桃腺リンパ球をConA(コンカナバリンA)で刺激したもの、ヒト扁桃腺リンパ球をTPA/PHAで刺激したもの、ヒト単球性白血病細胞株J111、ヒト前骨髄性白血病細胞株HL60、ヒト急性骨髄性白血病細胞株KG1、ヒト前骨髄性白血病細胞株ML3(Minovada, J. 「Leukemia」 (Gunz, F. & Hendoxson, E. 編) pp.119-139, Grune & Stratton, New York (1982))、ヒトT細胞白血病細胞株RPMI8402(Sahal Srivastere, J. Nat. Cancer Inst. 55, 11-14 (1975))、ヒトリンパ球性白血病細胞株Molt4および扁桃腺リンパ球細胞株BecIIである。上記細胞株のうち、J111、HL60、KG1、Molt4およびBecIIは、ATCCから入手可能である。

得られたRNAをホルマリン含有RNAゲルで電気泳動後、ナイロン膜にRNAを移し、固定後、第3図(c)、(d)のDNAオリゴマーLy2とLy3をラジオアイソトープ標識したものをプローブとして、ノザン解析を行なった。ヒト末梢血リンパ球画分およびJ111のRNAにおいて、陽性信号が約900塩基長、1300塩基長および1800塩基長のところに認められた。従って、この2種の細胞は、Ly2およびLy3DNAオリゴマーと相補的な配列を有するmRNAを合成していることがわかったが、陽性信号が微弱なことから、その量は通常のmRNA、例えばβ-アクチンのmRNAに比べて極めて微量であることが推定された。

まず、Brian Seed法(前述文献)によって、上記2種の細胞由来(末梢血リンパ球およびJ111)のmRNAを出発物質としてcDNAライブラリーを作製した。ライブラリーの大きさは(ライブラリーサイズ)約5~10万であった。これらのライブラリー(cDNAがベクターにつな

ったプラスミドが宿主大腸菌に入ったもの)を寒天培地にまき、通常の方法でオリゴマー-Ly2およびLy3をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングしたが、特異的な陽性クローンは得られなかった。理由として、ライブラリーの大きさに比して目的とするmRNAが少なすぎるために、目的クローンがcDNAライブラリーの中に含まれていないことが強く推定された。

そこで次に、PCR(ポリメラーゼ伸長連鎖反応、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション)の手法を独自に修飾して応用することにした。PCRの一般的な参考文献としては、Erllich.H.A.ら、Nature, 331, 461-462 (1988)が挙げられる。

PCRは、通常ある距離(遺伝子の長さ)を離れたところに、明確な、既知の短い(15~20塩基)配列が必要であるが、本発明の目標タンパク質の遺伝子については、そのような配列は不明であり、単にN末端のアミノ酸配列(17アミノ酸)がわかっているだけである。

の反応混合物を一度、DNAポリメラーゼ・クレノウ断片で反応させて、末端を平滑化処理した後、Brian Seed法で用いられるアダプター(DNAオリゴマー2本)を結合させ、KOA c濃度勾配の超遠心で分配した。分配フラクションをアガロースゲル電気泳動、サザンハイブリダイゼーション法で分析し、標識Ly2オリゴマーのプローブで陽性なフラクション(分画)をCDM8ベクターにつなぎ、大腸菌MC1061/P3に形質転換した。

こうして得られた形質転換体約12万個(末梢血リンパ球由来)と約17万個(J111由来)を、前記Ly2オリゴマーをプローブとして通常のコロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングしたところ、末梢血リンパ球由来のものから2個、J111由来のものから4個の陽性クローンが得られた。このうち、1個のクローン・P1を選び、DNAを通常の方法で取得してインサートを調べたところ、約350bpであった。このインサートを切り出して精製し、このDNA断片

そこで、本発明者らは鋭意工夫をこらし、PCR反応における第1のプライマーとして複数オリゴマーの混合物である第3図(b)のオリゴマー-Ly61を、第2のプライマーとして15塩基からなるオリゴdTを用いた。

Taqポリメラーゼと、基質として4種の(A, T, G, C)デオキシヌクレオシド3リン酸を用い、鋳型として前記2種の細胞(LPS刺激した末梢血リンパ球とJ111)由来のmRNA 2μgから、通常の方法で合成した2本鎖cDNAを用いて、パーキンエルマー・シータス社のPCR反応装置を用いて、熱変性、アニーリングおよび鎖伸長反応の40サイクル反応を行なった。

この反応混合物をアガロースゲル電気泳動したところ、エチジウムブロマイド染色では明瞭なバンドは認められず、特異的なバンドがどれかは不明であったが、ナイロン膜に転写後、標識したLy2オリゴマーをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なったところ、約400bp付近に明瞭な陽性バンドが認められた。そこで、こ

をニックトランスレーション法でラジオアイソトープ標識し、ハイブリダイゼーションで他の陽性クローンとの異同を見たところ、他の陽性クローンと結合したので、これらのクローンはすべてほぼ同じ配列を有していることが推定された。

そこで、前記のクローンP1のDNA塩基配列解析を行なった。得られた塩基配列を第2図に示した。第2図にはCDM8のベクター部分およびアダプター部分を示さず、インサート部分のみを示した。

第2図のDNA塩基配列を両方向から各3種のフレームでアミノ酸配列に翻訳したところ、第2図に示した方向の第1フレームのみが長いオープンリーディングフレームをつくった。そのアミノ酸配列を、DNA塩基配列とともに第4図に示した。はじめの16アミノ酸は、第3図(a)に示したMEM43をもとに精製され、決定されたヒトリンパ球由来のタンパク質のN末端配列の17アミノ酸のうち、2番目から17番目と全く同じであった。従って、第1図と第4図に示されたア

ミノ酸配列は、MEM43の認識するタンパク質のアミノ酸配列であると結論できる。PCR反応に用いたプライマー（オリゴマーLy61）の合成の都合上、第4図のDNA配列は第2番目のQ（グルタミン）からはじまっているが、その前にL（ロイシン）がついていることは前述のことから明らかなので、第4図の先頭（Qの前）にはLを付加して示した。

第1図および第4図に示したアミノ酸配列のタンパク質は、以下に述べるいくつかの事実から、マウスLy6抗原に対応するヒトリンパ球抗原であることが結論される。

- ① N末端配列がMEM43をもとに精製されたタンパク質のN末端配列と完全に一致する。MEM43抗体を用いた免疫化学的な、細胞および抗原の解析から、MEM43抗体の認識する抗原は、マウスLy6に対応するヒトリンパ球抗原であるらしいことが示唆されている。
- ② 第5図に示したマウスLy6C2aのアミノ酸配列と、約25%（成熟ペプチド部分）の類

スLy6C2aのアミノ酸配列と33%の類似性を示す。また、C（システイン）の数と配置がほとんど全く同じであり、このことは両タンパク質が同一の機能を有する類似体であることを強く示唆する。

さらに、本発明のヒトタンパク質のアミノ酸組成では、D（アスパラギン酸）とE（グルタミン酸）を加えたものは11個であり、K（リジン）とR（アルギニン）とH（ヒスタミン）を加えたものは8個である。一方、マウスLy6C2aでは、DとEの和は10個、KとRとHの和は9個であり、それぞれ酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の比率は非常によく似ている。加えて、両者のアミノ酸数も分子量も非常によく似ている。

- ③ 本発明のタンパク質アミノ酸配列をDoolittle法によって疎水性分布を示したものを第6図に、マウスLy6C2aのそれを第7図に示した。

第6図と第7図からわかるように、両者は中央部の一部を除いて非常に類似性が高く、とり

似性があり、特にN末端部分と中央部分でよく似ている。大きさもほぼ同じである。約25%しかホモロジーがないことは、逆にマウスのcDNAをプローブとしてヒトの遺伝子が同定できなかったことをよく説明している。本発明のアミノ酸配列とマウスLy6C2aのそれを並べ、マキシマムマッチングさせたものを第5図に示した。

マウスLy6C2aの遺伝子配列は、米国ロスアラモス研究所の遺伝子配列データベースLASL-Gen Bankに登録された配列（ID名：HUSLY6C2A）からとり、それをアミノ酸配列に翻訳した。

第5図の下側に示したアミノ酸配列は成熟タンパク質を示し、L（ロイシン）からはじまっている。マウスLy6C2aの遺伝子配列の原報は、Palfree, R.G.E. らによる Journal of Immunology, 140, 305-310 (1988) である。

第5図に示したように、本発明のアミノ酸配列はN末端にL（ロイシン）を加えると、マウ

わけC末端部分には全く共通して強疎水性部分があり、これはホスファチジルイノシトールアンカープロテイン（PIアンカリングタンパク質）であることを強く示している。マウスLy6C2aについては、このことは証明されており、従って本発明のタンパク質もリンパ球表面抗原であることが強く示唆される。この疎水性／親水性の解析は、ソフトウェア開発者のGENETYXプログラムを使用した。

以上のことより、本発明のタンパク質およびその遺伝子は、マウスリンパ球表面抗原Ly6に対応するヒトリンパ球表面抗原であることが結論される。

本発明は、ヒトリンパ球におけるマウスLy6に対応する表面抗原（CD59と命名される）の完全な特定化を含むものであり、それゆえに今後の開発研究の基礎となる重要な発明であると規定できる。マウスLy6においては、若干の配列の違いによる亜型を含むファミリーが同定されており、従って、ヒトにおいてもそのようなものの同

定は当然予測できることであり、本発明の遺伝子配列は、そのための有力な手段となるものである。従って当然のことながら、それらヒトCD59ファミリー、すなわち同効物の遺伝子配列とアミノ酸配列も本発明に含まれる。

例えば、本発明のタンパク質のC末端には、約20個弱の疎水性アミノ酸が並んでおり、これが細胞膜表面タンパク質であるための要素となっているが、このC末端疎水性領域をとったタンパク質を遺伝子組換え技術などの手法によって人為的に調製すれば、ヒトCD59抗原を介したリンパ球活性化を抑制することができる可能性もある。

このような応用展開は、本発明の記載するタンパク質となかなくその遺伝子によって可能となる技術であるので、当然本発明の範囲に含まれる。従って、本発明のヒトリンパ球表面抗原は、第1図に示すアミノ酸配列を有するが、実質的にこれと同等の機能を有するものであれば、アミノ酸配列の置換、欠失、挿入があっても本発明に含まれる。

以下の実施例において、用いられた方法の一部は一般的なものであり、次に示す成書にそれらの実験処方が詳しく記載されている。

Ausubel, F.M.ら編, "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons, 1987年および Maniatis, T.ら著, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, 1982年。

以下、実施例中では上述の成書を前述成書として引用する。

実施例 1

mRNAの調製

株化細胞J111(ヒト単球性白血病細胞)の培養は、10%牛胎児血清を含むダルベッコMEM培地(ニッスイ社)で行なった。株化細胞HL60(ヒト前骨髄性白血病細胞)、KG1(ヒト急性骨髄性白血病細胞)、ML3(ヒト前骨髄性白血病細胞)、RPMI8402(ヒトT細胞白血病細胞)、Molt4(ヒトリンパ芽球性白血病細胞)、およびBec1(扁桃腺リンパ球細胞)

また、本発明で示されるリンパ球表面抗原は、マウスLy6の場合、リンパ球活性化に関与し、自己免疫疾患と強く関連があることが知られているので、本発明はヒトにおけるCD59抗原の機能を科学的に解明し、またそれを工業的に利用する場合に、最も重要な材料を提供するものである。

すなわち、本発明のタンパク質をもとにして抗体(モノクローナル抗体を含む)を作成すれば、その抗体はリンパ球機能の研究に重要な役割を果たすと理解でき、同時にその抗体を用いて自己免疫疾患のような免疫過剰応答の診断に有用である。また、その抗体がヒトリンパ球を活性化するものである場合には、該抗体を抗がんあるいは抗感染症の治療に応用することもでき、抗体がヒトリンパ球の機能を抑制するものである場合には、該抗体を免疫応答過剰疾患(自己免疫疾患)の治療に応用することもできる。

【実施例】

以下には実施例によって、本発明をさらに具体的に説明する。

の培養は、10%牛胎児血清と最終濃度 $5 \times 10^{-5}M$ の2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地(ニッスイ社)で行なった。

ヒト末梢血リンパ球画分は、正常人より採血した後、ヘパリン処理した遠沈管での遠心を含む通常の方法で取得したフィーコート分画の細胞を遠心分離により集め、RPMI1640培地に懸濁し、 $10 \mu g/ml$ のLPSを加え、15時間培養した。ヒト扁桃腺リンパ球は、通常の方法で細胞を採取した後、RPMI1640培地に懸濁し、ConA($10 \mu g/ml$)あるいはTPA:PHA($5 \mu g/ml$:1%)を加え、20時間培養した。

細胞の培養は、すべてCO₂インキュベーターで行なった。細胞に塩化リチウム/グアニジンチオシアネート溶液(50gのグアニジンチオシアネートを25%の塩化リチウム溶液58mlに溶解し、0.45μのフィルターで濾過した後、2mlの2-メルカプトエタノールを加えたもの)を加え、得られた粘稠溶液を40秒間2回ポリトロンをかけ、染色体DNAを分断した。

この細胞ホモジネートを1/3量の5.7M塩化セシウム(100mMのEDTAを含む)溶液の上に重層し、35,000rpmで20時間20℃で遠心した。遠心管の底に沈殿した全RNAを、少量の塩化リチウム/グアニジンチオシアネート溶液に溶かし、1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液と2.5倍量のエタノールを加え、-20℃に一晩放置し沈殿させた。

ヒト末梢血リンパ球、ヒト扁桃、J111、ML3、KG1、HL60については、続いて全RNAを常法に従って、オリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィーにかけてポリA⁺RNAを選別収集した。

実験に使用した細胞数は以下のとおりである。

J111: 3×10^8 細胞、ヒト末梢血リンパ球: 1.2×10^9 細胞、ヒト扁桃: 5×10^8 細胞、ML3: 1.4×10^9 細胞、KG1: 2×10^8 細胞、HL60: 3×10^8 細胞、RPMI8402: 4×10^7 細胞、Molt4: 4×10^7 細胞、BecII- 5×10^7 細胞。

(B) ノザンハイブリダイゼーション

実施例1で得た全RNA(10~20μg)あるいはポリA⁺RNA(2~5μg)をホルマリン含有1%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロン膜(アマシャム社“ハイボンドN”)に移した後、ゲルとの接触面を下にして紫外線固定(2分30秒間)した。プレハイブリダイゼーションを42℃で1時間行なった後、ハイブリダイゼーションも42℃で1晩行なった。洗いも42℃で行なった。ハイブリダイゼーション溶液の組成は、5×SSPE、5×Denhardt's、0.1%SDS、100μg/mlサケ精子DNA(熱変性)、洗液は、2×SSC、0.1%SDSである。これらの方法は、前述成書に準じて行なった。

オートラジオグラフィーの結果、Ly2、Ly3の両プローブでJ111細胞のポリA⁺RNAにおいて、約900塩基長、1300塩基長、1800塩基長のところに陽性バンドが認められた。J111細胞と比較すると非常に弱い信号であるが、ヒト末梢血リンパ球のポリA⁺RNAでも認

実施例2

ヒトLy6mRNAの検出

(A) DNAプローブの合成

第3図(a)上に示したMEM43抗体の認識する抗原タンパク質のN末端アミノ酸配列に基づいて、第3図(b)~(d)に示した3種類のオリゴヌクレオチド(オリゴマー)Ly61、Ly2、Ly3を合成した。Ly2、Ly3はその相補鎖の配列を示した。

従って、実際に合成して使用したDNAオリゴマーの配列は、次のとおりである。

Ly61: CAATGTTATAATTGTC
 G C C C C C

Ly2: ACIGCIGTTTTACAATCIGCIGTIGGATT
 C C C C C C

Ly3: GCIGTIGGATTIGGACAATTATAACA
 C C C C C C

ノザンハイブリダイゼーションのプローブとしては、Ly2とLy3を用いた。5'水酸基をT4キナーゼとγ(³²P)ATPを用いてリン酸化標識した。

められた。他の細胞では検出できなかった。

実施例3

cDNAライブラリーの作製

J111とヒト末梢血リンパ球より調製したポリA⁺RNA5μgを用いて、ブライアン・シード(Brian Seed)の方法(前述文献)によりcDNAライブラリーを作製した。2本鎖のcDNA合成は、cDNA合成キット【アマシャム(Amersham)製】を利用し、そのプロトコールに準じて行なった。2本鎖cDNAに、T4DNAリガーゼを用いて、リン酸化されたアダプター(12mer: CTTTAGAGCACACAおよび8mer: CTCTAAAG)を連結した。余分なアダプターと短いcDNAを取り除くために、5~20%酢酸カルシウム密度勾配遠心(50,000rpm、22℃で3時間)を行なった。遠心管の底に注射針を刺し、0.4mlずつ分画した。6番目までの分画をCDM8ベクター(Brian Seed 前述文献)のBstXI部位に、T4DNAリガーゼにより連結した。大腸菌MC1061/P3株(前述文献)

を通常の方法で形質転換して得られた cDNA ライブラリーの大きさは、J111 の場合約 10 万、末梢血リンパ球の場合約 5 万であった。

これらのライブラリーを実施例2で作成したL y 2とL y 3 DNAプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングを行なった。プレートあたり約2, 000個のコロニーが出るように粗換え大腸菌をまいた。各々のプレートについて、2枚のレプリカプレートを作製した。レプリカプレート上のコロニーを541ペーパー〔ワットマン (Whatmann) 製〕に移したあと、アルカリ変性、中和、洗いの操作を行ない、プラスミドDNAをフィルター上に固定した。ブレハイブリダイゼーションを42℃で1~数時間行なった後、ハイブリダイゼーションを42℃で一晩行なった。洗日も42℃で行なった。これらの操作は、前述成書に準じて行なった。

オートラジオグラフィーの結果、Ly2プローブ、Ly3プローブとも非特異的な結合が強いことがわかった。J1111ライブラリーについては、

約20万個、ヒト末梢血リンパ球ライブラリーについては、約5万個スクリーニングを行なったが、特異的な陽性クローンは得られなかった。

实施例 4

PCR法によるヒトLy6cDNAの増幅

前述のJ111、ヒト末梢血リンパ球(LPS刺激)由来のポリA⁺RNA 1μgより、cDNA合成キット(前述)を用いて2本鎖cDNAを合成した。合成したcDNAの1/3量(100ng以上の2本鎖cDNAを含むものと推定した)を1回のPCR(ポリメラーゼ伸長連鎖反応、前述文献)実験に用いた。PCR反応における第1のプライマーとして第3図(b)のオリゴマーLy61を、第2のプライマーとしてオリゴdT(15mer)を用いた。反応液組成は次のとおりである。

水	77.1 μ l
10 \times PCR緩衝液	10 μ l
デオキシヌクレオシド三磷酸	2 μ l (各200 μ M)
プライマー	2 μ l (1 μ M)
オリゴdT (15塩基)	1.4 μ l (1 μ M)
鋳型DNA (2本鎖cDNA)	7 μ l (~100ng)
Taq I ポリメラーゼ	0.5 μ l (2.5 U)
計	100 μ l

DNAサーマルサイクラーPJ1000(パーキンエルマー・シータス社)を用いて、熱変性94℃:1分、アニーリング40℃:2分、鎖伸長反応72℃:3分の条件で40サイクル反応を行った。

この反応混合物の1/5量を、1%アガロース
ゲル電気泳動したところ、エチジウムブロマイド
染色では明瞭なバンドは認められなかった。ゲル
をアルカリ変性30分間、中和15分間の2回行
なった後、ナイロン膜【アマシャム・ハイボンド
N (Amasham, Hybond N)】にDNAを転写し、
紫外線で固定(2分30秒間)した。実施例2で
合成したLy2オリゴマーをプローブとしてサザ
ンハイブリダイゼーションを行なった。この操作
は、前述成書に準じて行なった。プレハイブリダ
イゼーションを42℃で1~数時間行なった後、
ハイブリダイゼーションを42℃で1晩行なった。
洗いも42℃で行なった。オートラジオグラフィ
の結果、約400塩基長付近に明瞭なバンドが
認められた。

反応混合物の残り4/5量を、フェノール：クロロホルム（1：1）処理2回、クロロホルム処理1回した後、エタノール沈殿を行ないDNAを回収した。このDNAの1/5量を用いて、前述と同じ反応組成、反応条件でさらに40サイクルの反応を行なったところ、サザンハイブリダイゼーションで陽性バンドの増加が認められた。

実施例 5

Ly2プローブと交叉するcDNAのクローニング

実施例4で得られた反応混合物（40サイクル2回）をフェノール：クロロホルム（1：1）処理2回、クロロホルム処理1回を行なった後、エタノール沈殿を行ないDNAを回収した。DNAポリメラーゼ（クレノウ断片）処理を22℃で30分間行ない末端を平滑化した。実施例3で利用したものと同じリン酸化アダプターをT4DNAリガーゼにより連結した（16℃、一晩）。余分なアダプターとPCR反応に用いたプライマーを取り除くために、酢酸カリウム密度勾配超遠心

（前述）を行なった。前述のように0.4mlずつ12フラクションに分配した。各々の1/10量を1%アガロースゲル電気泳動し、標識Ly2オリゴマーをプローブとしてサザンハイブリダイゼーション（前述）を行なった。オートラジオグラフィーの結果、J111の場合も末梢血リンパ球の場合も8番目のフラクションに陽性バンド（約400塩基長）が認められた。

8番目のフラクションからエタノール沈殿によりDNAを回収し、このDNAをCDM8ベクター（前述）のBst XI部位にT4DNAリガーゼにより連結した（16℃、一晩）。大腸菌MC1061/P3（前述）を通常の方法で形質転換したところ、J111の場合約12万個、末梢血リンパ球の場合約17個の形質転換体を得られた。

各々のライブラリー約2,500個について、前述のLy2オリゴマーをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法（前述文献）でスクリーニングしたところ、J111由来4個（J-2、J-6、J-7、J-9）、末梢血リンパ球

由来2個（P-1、P-2）の陽性クローンが得られた。このうち1個のクローンP-1を選び、DNAを前述成書に準じて取得した。このDNAをXho Iで切断し、インサートcDNAの長さを調べたところ、約350塩基長であった。このインサートを切り出しジーンクリーン（バイオ101（Bio 101）社製）で精製した。DNA断片をニックトランスレーション法で α （ 32 P）CTPで標識した。この操作は、前述成書に準じて行なった。この標識DNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーション（プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション65℃、洗い50℃）で他の陽性クローンとの異同を調べたところ、他の陽性クローンと結合した。それゆえに、これらのクローンはすべてほぼ同じ配列を有していることが推定された。

実施例 6

cDNAクローンの塩基配列の決定

CDM8ベクターのシーケンス用プライマー（5' TAATACGACTCACTATA 3'、

5' CTTCACTAAAGATCCTCT 3'）を用い、デオキシ-7-デアザグアニントリホスフェートを用いたジデオキシ法で配列解析を行なった。

得られた塩基配列を第2図に示した。PCR反応に使用したLy61プライマーの配列に続いてLy2プローブに対応する配列があり、これらはMEM43が認識する抗原タンパク質のN末端アミノ酸配列より推定される塩基配列（第3図（a））のうちの1種と一致していた。

また、塩基配列に対応する翻訳アミノ酸配列は第1図に示すとおりで、グルタミン酸からバリンまで16アミノ酸が完全に一致していた。

〔発明の効果〕

本発明によって得られたcDNAをプローブとして用いることにより、マウスのように類似遺伝子からなるファミリーが存在するかどうか、またリンパ球活性化とどのように関わっているか、また自己免疫疾患などの免疫過剰と関連があるかどうかなど、ヒトの免疫系の研究にとって重要な進

展がなされることが期待できる。また同時に、本発明のヒトリンパ球抗原を、例えばそれに対する特異的抗体を作成するなどの方法によって、抑制することによる自己免疫疾患治療薬や、活性化することによる抗ガン薬、抗感染症薬の開発につながることを期待できる。すなわち、本発明によってはじめてマウスLy6に対応するヒトリンパ球抗原の研究および工業的応用の可能性が大きく開けるといえる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のヒトリンパ球表面抗原のアミノ酸配列を、第2図は、それをコードする遺伝子配列の1例を示す。

第3図(a)は、MEM43抗体が認識する抗原タンパク質のN末端アミノ酸配列および該アミノ酸配列を指定しうるDNA配列を示し、第3図(b)、(c)、(d)は、本発明で用いた合成オリゴマーLy61、Ly2、Ly3の配列を示す。タテに並んだものは核酸塩基の混合物を、Iはデオキシイノシンを示す。

第4図は、本発明のヒトリンパ球表面抗原のアミノ酸配列を、その遺伝子配列とともに示したものである。

第5図は、本発明のアミノ酸配列とマウスLy6C2aのアミノ酸配列をマキシマムマッチングさせたものである。図中*印は一致するアミノ酸配列を、+印はシステインを示す。

第6図は、本発明のアミノ酸配列のDoolittle法による疎水性分布を示すものであり、第7図は、同法によるマウス6C2aの疎水性分布を示すものである。

特許出願人 東レ株式会社

```

LeuGlnCysTyrAsnCysProAsnProThrAlaAspCysLysThrAlaValAsnCysSerSer
1      10      20
AspPheAspAlaCysLeuIleThrLysAlaGlyLeuGlnValTyrAsnLysCysTrpLys
30      40
PheGluHisCysAsnPheAsnAspValThrThrArgLeuArgGluAsnGluLeuThrTyr
50      60
TyrCysCysLysLysAspLeuCysAsnPheAsnGluGlnLeuGluAsnGlyGlyThrSer
70      80
LeuSerGluLysThrValLeuLeuLeuValThrProPheLeuAlaAlaTrpSerLeu
90      100
HisPro
103

```

FIG 1 (a)

```

10      20      30      40      50      60
CAGTGCTACA ACTGTCTCTAA CCCAACTGCT GACTGCAAAA CAGCCGTCAA TTGTTTCATCT
70      80      90      100     110     120
GATTTCGATC CCGTCTCTCAT TACCAAGCTT GGGTACAAG TGTATAACAA GTGTTGGAAG
130     140     150     160     170     180
TTTGAGCATT GCAATTTCAA CGACGTCACA ACCCGCTTGA GGGAAAAATGA GCTAACGTAC
190     200     210     220     230     240
TACTGCTGCA AGAAGGACCT GTGTAACCTT AACGAACAGC TTGAAAATGG TGGGACATCC
250     260     270     280     290     300
TTATCAGAGA AAACAGTTCT TCTGCTGGTG ACTCCATTTC TGGCAGCAGC CTGGAGCCTT
310     320     330     340
CATCCCTAAG TCAACACCAG GAGAGCTTCT CCCAAA

```

FIG 2 (a)

[illegible]

CAA TGT TAT AAT TGT CC 17mer Ly61

AC IGC IGT TTT ACA ATC IGC IGT IGC AAT
C G G G

GC IGT IGG ATT IGG ACA ATT ATA ACA
G C C G G
LY 3 26mar

अनु ३

```

      10          20          30          40          50          60
CAGTGTCTCAACACTGCTCAACCCAACTGTGACTGCAAAACGCCGCTCAATTGTTTCATCT
LeuGlnCystTyrAsnCysProAsnProThrAlaAspCysLysThrAlaValAsnCysSerSer
      70          80          90          100         110         120
GATTTTGATGCGGTGTCATTACCAACAGCTGGGTTACAGCTGTATAACAAGCTCTTGGAAAG
AspPheAspAlaCysLeuIleThrLysAlaGlyLeuGlnValTyrAsnLysCysTrpLys
      130         140         150         160         170         180
TTTGAGCACTTGCAATTTCAACGACGCTCACAACCCGCTTGAGGGGAAAATGAGCTAACGTAC
PheGluHisCysAsnPheAsnGluThrThrArgLeuArgGluAsnGluLeuThr
      190         200         210         220         230         240
TACTGCTGCAGAAGAGCACTGTGTAACTTTAAACGAACGCTTGAAAATGCTGGGCACATCC
TyrCysCysLysLysAspLeuCysAsnPheAsnGluGlnLeuGluAsnGlyGlyThrSer
      250         260         270         280         290         300
TTATCAGAGAAAACAGTCTTCTGCTGGTGACTCCATTTCTGGCAGCAGCTGGGACGCTT
LeuSerGluLysThrValLeuLeuLeuValThrProPheLeuAlaAlaAlaTrpSerLeu
      310         320         330
CATCCCTAAGTCAACACCAAGGAGGCTTCTCCCAA
HisPro***
      183

```

第 4 题

Percentage = 33.01(%)

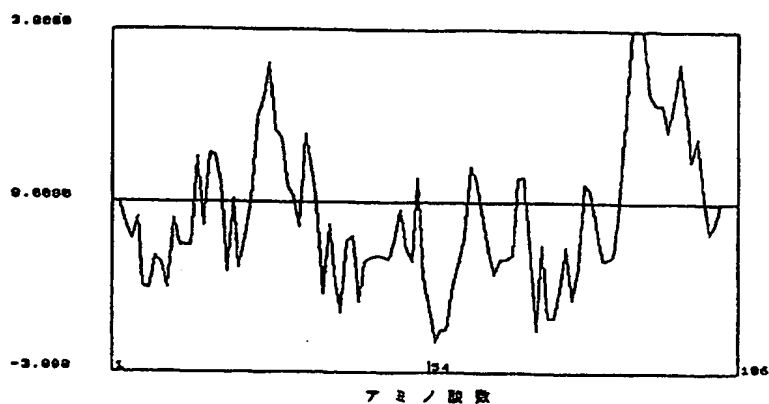
LQCYNC-PHP-TADCKTAVMC-SSD-FDACLITXAG-L---QVYN-K---CWKFHCNPFMDVTRL
 LQCYECYGVPIETSCP-AVTCRASDGP--C-IAQNIETEDSORRKLKTRCISF--CPAGVPIKDP

```

      **      *
RENELTYTCCKKDLCHFNEQLNGGCTSLSERTVLLLVTPFLAAAWSLNP (human)
      *      *      *      *      *
NIRERT-SCCSEDLG--RAAVPTAGSTWTHAGVLLFSLSSVILQTL (mouse)

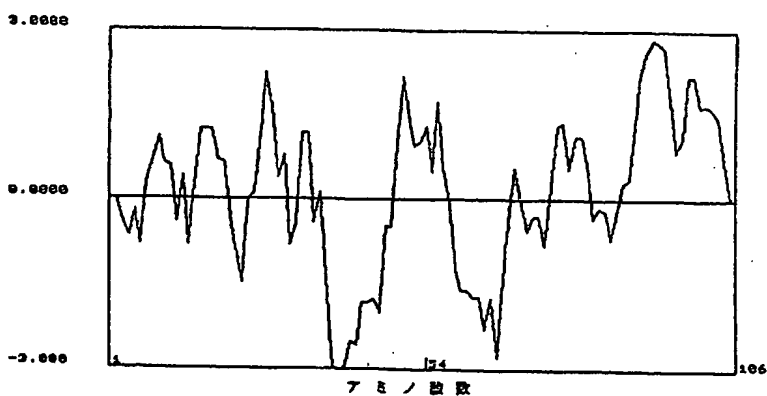
```

第五图



Dooley 法による疎水性パラメータ
(+が疎水性)

図 6



Dooley 法による疎水性パラメータ
(+が疎水性)

図 7